第1卷第2期　　动　物　学　研　究　　Vol. 1, No. 2
1980年5月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　May, 1980

尖吻蝮（Agkistrodon acutus）蛇毒的分离及其生物活性的研究

张洪基　肖昌华　唐绍宗　杨筠茹

（中国科学院昆明动物研究所　昆明）

摘　要

用二乙氨乙基纤维素柱层析法将尖吻蝮蛇毒分成15个组分，并对粗蛇毒及各分离组分进行了各种生物活力的测定，结果表明：1.粗蛇毒中存在有精氨酸酯酶，蛋白水解酶、碱性磷酸酶，磷酸二酯酶，5′—磷酸二酯酶，5′—核苷酸酶，ADP酶、ATP酶，L—氨基酸氧化酶及磷酸酯酶A等10种酶活力；但不存在胆碱酯酶及核糖核酸酶的活力；2.蛋白水解酶，5′—核苷酸酶及ADP酶普遍存在于粗蛇毒经分离后的各组分中；3.精氨酸酯酶存在于组分6—13中，以第8组分的活性最高；4.第1及5—13组分显示有较高的凝血活性；第1—2组分及9—15组分显示有出血毒；第12（小鼠死亡率2/5）及第13组分（小鼠死亡率3/5）显示有较高的毒性；第1—2，9—15组分显示有纤溶活性。

早年，有人用纸上电泳法研究尖吻蝮蛇毒，发现其主要成分是酸性蛋白。其后，有人用淀粉凝胶电泳法将尖吻蝮蛇毒分出6个组分；用二乙氨乙基纤维素柱层析法分出7个组分；用二乙氨乙基葡聚糖凝胶柱层析法分出12个组分。同时，亦对蛇毒中存在的凝血活性，精氨酸酯酶活性，酪蛋白水解活性，进行了比较[1,2]。Ouyang 等人还对尖吻蝮蛇毒中存在的凝血酶样活性，纤维蛋白溶解活性及抗凝血组分进行了进一步的纯化和研究，有关尖吻蝮蛇毒中生物活性物质的研究至今尚未见有较为全面的报导。

本文对尖吻蝮蛇毒进行了分离并对各组分的生物活性进行了较为广泛的研究。

材料和方法

一、蛇毒：尖吻蝮（*Agkistrodon acutus*）蛇毒收集自湖南长沙，沅陵地区。取得的新鲜蛇毒液，迅速置于盛有五氧化二磷的真空干燥器中，真空干燥。一般1—2小

本文于1680年2月4日收到。

时即可得到疏松，块状，无定形淡黄色固体。将干燥的粗蛇毒收集于棕色瓶，保存在干燥器中备用。

二、仪器，试剂：SF—400L部分收集器(日本)、751型分光光度计（上海），二乙氨乙基纤维素（DEAE—Cellulose DE52 英 Whatman），苯甲酰—L－精氨酸乙酯（BAEE）合成，熔点194—196°C，酪蛋白标准试剂（卫生部药品生物制品研究所），氯化乙酰胆碱（cp上海试剂三厂），L－亮氨酸（层析纯），5′－AMP（生化试剂），ATP（生化试剂），双对硝基苯磷酸（熔点175—177°C，系上海生化所出品），ADP（法，CR》尿核苷酸（匈牙利）酵母核糖核酸，凝血酶（英，Koch Light），磷酸苯二钠（CP、上海新中化学厂）、卵磷脂（生化试剂，上海蛋禽二厂），纤维蛋白元（上海生物制品所）。

三、酶活力测定：取粗蛇毒(5mg/ml，溶于0.05M tris—HCl缓冲液中，pH7.6。内含0.01M $CaCl_2$）0.1ml或各分离组分100μg（以蛋白质含量计）分别测定以下12种酶活性。精氨酸酯酶、蛋白水解酶、磷酸二酯酶，5′—核苷酸酶，ADP酶，ATP酶，核糖核酸酶，胆碱酯酶，L－氨基酸氧化酶，磷脂酶A参照涂光涛等[3]的方法测定。碱性磷酸酶及5′—磷酸二酯酶分别参照文献介绍的方法[4,5]测定。

四、凝血活性测定：取若干小试管，每管加入0.3ml 0.4%纤维蛋白元液（溶于0.05M tris—HCl缓冲液中，pH7.6），试管置于37°C水浴中保温2分钟，然后加入试样（粗蛇毒0.1ml或分离组分100μg），迅速摇匀，记时，至凝结完全（试管内的溶液不再流动），是为该试样的凝血时间。重复操作一次，取二次的平均值。

五、出血毒素活力的测定：重约160g的大白鼠，用乙醚麻醉后，在背部选二个点，剪毛注入100μg试样。24小时后，乙醚麻醉处死，剥皮观察注射部位是否有出血斑点。若有出血斑点，表明试样中含有出血毒素。斑点越大，则出血毒素含量越高。

六、纤溶活性测定：参照Astrup等的方法[6]测定。

七、毒性测定：昆明品系小白鼠，重约20g，每组5只（雌雄搭配。每组雌鼠2只，雄鼠3只）。每个试样用一组小白鼠作实验。每只小白鼠腹腔注射100μg试样。观察48小时，统计死亡率，

结　　果

DE_{52}纤维素柱层析（25×520mm）取真空干燥粗蛇毒2g，溶于20ml 0.005M pH8.0醋酸铵缓冲液流速30ml/小时，5ml/管。先用醋酸铵缓冲液pH8.0，0.005M对0.1M各取1000ml，进行梯度洗脱。收集到200管后改用0.1M对0.5M也各取1000ml，继续进行另一阶段的梯度洗脱。所收集的洗脱液，在280mμ下，测定其光吸收值。尖吻蝮粗蛇毒可分出15个组分，见图1。

表1列出粗蛇毒及各分离组分的酶活力定量测定结果，从表1可以看出：1.粗蛇毒及各分离组分中，不含胆碱脂酶及核糖核酸酶；2.蛋白水解酶。5′—核苷酸酶及ADP酶普遍存在于粗蛇毒及各分离组分中；3.蛋白水解酶，磷酸二酯酶，5′—核苷酸酶、ADP酶，ATP酶、及磷酸脂酶A以第一组分含量较高；4.L－氨基酸氧化酶以第4、第

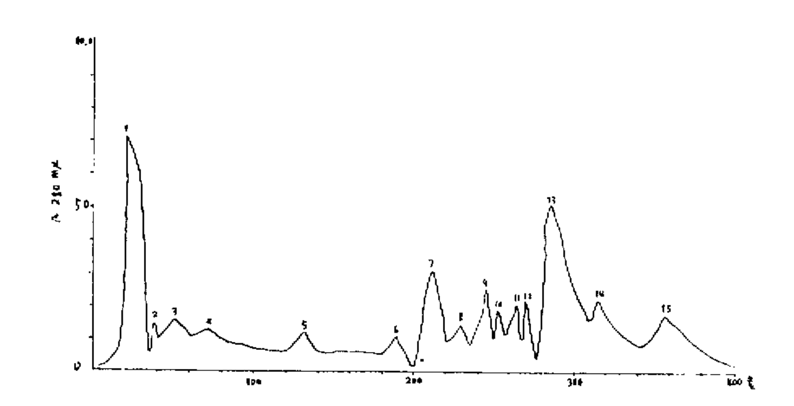


图1　尖吻蝮蛇毒的二乙氨乙基纤维素柱层析分离

15组分含量较高；5.精氨酸酯酶以第8组分含量较高；6.碱性磷酸酶以第9，第10组分含量较高；7.5′—磷酸二酯酶存在于粗蛇毒、及第1—2，4、10—15组分中。

第1及5—13组分显示较高的凝血活性，见表2。

粗蛇毒、第1—2组分及9—15组分含有出血毒素，见表3。

第12（小白鼠死亡率2/5）及第13（小白鼠死亡率3/5）组分显示较高的毒性，见表4。

粗蛇毒及第1—2，9—15组分显示纤溶活性，见表5。

讨　论

用二乙氨乙基纤维素柱层析法，将尖吻蝮粗蛇毒分出15个组分。而Ouyang在相近的条件下、仅分出7个或者12个组分[1,2]。表明作者取得较好的分离结果。

对尖吻蝮粗蛇毒及各分离组分进行了16种生物活力的测定发现尖吻蝮蛇毒中存在精氨酸酯酶、蛋白水解酸酶、碱性磷酶、磷酸二酯酶、5′—磷酸二酯酶，5′—核苷酸酶、ADP酶、ATP酶，L—氨基酸氧化酶、及磷酸脂酶A等10种酶活力，但不存在胆碱酯酶及核糖核酸酶的活力；多数组分显示凝血、出血及血纤维溶活性、第12、13组分显示较高的毒性。尖吻蝮蛇毒中，凝血酶样酶，溶血纤维酶、精氨酸酯酶、酪蛋白水解酶，运动徐缓素释放酶等，广义上讲都应属于蛋白水解酶，尖吻蝮蛇的出血毒，应是上述各活性的综合表现，此外，粗蛇毒及第6—13组分所显示的精氨酸酯酶活性亦可能包括凝血酶样酶，运动徐缓素释放酶等几种生物活性物质的作用。

蛇毒的分离及各分离组分的活力测定，将有利于蛇毒生物化学及药理学的进一步研究。如对红口蝮蛇毒中溶血纤维酶（Ancrod）的研究，从而提供了一个较为安全专一的新抗凝血剂，是一较为成功的突出例子。

表 1 尖吻蝮粗蛇毒及其各分离组分的酶活力（单位/mg）

酶	粗毒	1	2	3	4	5	6	7	8	6	10	11	12	13	14	15
精氨酸酯酶	264	—*	—	—	—	—	560	240	850	400	260	320	540	340	—	—
蛋白水解酶	54	160	40	80	30	45	65	82.5	47.5	55	65	80	60	55	48	110
碱性磷酸酯酶	4.5	—	—	4.8	4.5	7.5	3.2	7.0	—	10.0	9.0	—	—	—	4.0	4.3
磷酸二酯酶	17.5	15	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5′—磷酸二酯酶	0.6	0.7	0.5	—	0.5	—	—	—	—	—	0.8	0.7	0.7	0.8	0.6	0.5
核糖核酸酶	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5′—核苷酸酶	9.3	45.0	2.5	1.6	4.2	6.3	7.2	14.2	33.3	20.0	20.5	18.3	16.7	4.1	4.9	1.7
ADP酶	2.1	10.8	0.7	1.2	2.3	3.2	4.2	6.7	8.3	6.7	4.8	5.8	5.7	2.5	1.8	—
ATP酶	27.5	26.0	—	—	—	—	—	—	1.0	—	—	—	—	2.0	—	—
L—氨基酸氧化酶	5.4	—	—	—	13.8	5.8	2.8	1.3	2.3	1.5	2.5	2.7	2.8	2.8	2.1	14.7
胆碱脂酶	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
磷脂酶A (Hu50)	1800μg	170μg	—	—	—	—	—	330μg	—	—	—	—	—	—	—	—

* "—"表示不含有该酶，以下同。

表 2 尖吻蝮粗蛇毒及其各分离组分的凝血活性

	粗毒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
凝血活性	3′10″	56″	10′	11′	2′51″	49″	22″	33″	13″	15″	13″	15″	10″	10″	1′24″	10′

表 3 尖吻蝮粗蛇毒及其各分离组分的出血毒素（Cm^2）

	粗毒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
出血毒活性	3.6	5	2.5	—*	—	—	—	—	—	1.0	0.6	4.5	3	2.25	3	0.04

* 无出血毒素。

表 4 尖吻蝮粗蛇毒及其各分离组分的纤溶活性（mm^2）

	粗毒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
纤溶活性	30	48	15	—*	—	—	—	—	—	16	30	60	30	100	96	100

* 无纤溶活性

表 5　　尖吻蝮粗蛇毒及其各分离组分的毒性（死亡率）

	粗　毒	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
毒　性	LD50为 9.15μg/g	—*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2/5	3/5	—	—

* 未观察到小鼠死亡

参 考 文 献

〔1〕 Cheng H. C. et al. (1967) Isolation of coagulant and anticoagulant principles from the venom of *Agkistrodon acutus*, *Toxicon*, **4**:235—243.

〔2〕 Ouyang C. et al, (1976) Purification and charaterization of fibrinolytic of *Agkistrodon acutus* venom, *Biochem. Biophy. Acta*, **439**: 146—153.

〔3〕 涂光俦等 (1976) 我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力的测定，生物化学与生物物理学报，8 : 151—156。

〔4〕 上海第六人民医院检验组编 (1973) 快速检验诊断资料汇编，人民卫生出版社，202—210。

〔5〕 北京大学制药厂编 (1972) 微生物学和酶学基本知识，科学出版社，213—215。

〔6〕 Astrup T. et al, (1952) The fibrin plate methods for estimating fibrinolytic activity, *Arch. Biochem Biophy*, **40**: 346

Study on isolation from the venom of *Agkistrodon acutus* and its biological activity

Zhang Hong-ji, Xiao Chang-hua, Tang Shao-zong, Yang Jun-ru

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

15 fractions were obtained from the venom of *Agkistrodon acutus* by column chromatography. Chemical principles of biological activity of crude venom and every fraction were examined the experimental results are as follows,

1. Crude venom and each fraction contain argininie esterase, protein hydrolase, alkaline-phosphatase, phospho-biesterase, 5′-phospho-biesterase, 5′-nucleotidase, adenosine diphosphatase, adenosine triphosphatase, L-amino-acid oxidase and phospho-esterase A, but choline-esterase and ribonuclease are not found.

2. Protein hydrolase, 5′-nucleotidase and adenosine diphosphatease exist commonly in crude venom and each fraction.

3. Arginine esterase exists in crude venom and the sixth-to thirteenth fractions but the highest activity appears in the eighte fraction.

4. The first and the fifth to thirteenth fraction show higher blood coagulant activity. Crude venom, the first, the second and the ninth to the fifteenth fractions show bleeding toxin, The twelfth (the mortality is 2/5 on mice) and the thirteenth fractions (the mortality is 3/5 on mice) show higher toxicity. Crude venom, the first, the second and the ninth to the fifteenth fractions show fibrinolytic activity.